

血卟啉甲醚对斜纹夜蛾 SL 细胞的氧化损伤

王玉健, 徐汉虹*, 廖绍裕, 张前锋

(华南农业大学, 农药与化学生物学教育部重点实验室, 广州 510642)

摘要: 通过研究血卟啉甲醚(hematoporphyrin monomethyl ether, HMME)对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (SL) 细胞的增殖抑制率 IC_{50} 、处理后细胞内丙二醛(malondialdehyde, MDA)的生成量、细胞内还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)水平和细胞器超微结构的变化, 明确血卟啉甲醚对 SL 细胞的氧化损伤, 并探讨将血卟啉甲醚及其衍生物拓展应用到农业害虫防治领域的可行性。用 MTT 法测定血卟啉甲醚光照处理下对 SL 细胞 24 h 和 48 h 的 IC_{50} 值分别为 8.35 $\mu\text{g/mL}$ 和 7.66 $\mu\text{g/mL}$ 。硫代巴比妥酸(TBA)法测定表明, 血卟啉甲醚光活化后能导致胞内 MDA 含量明显升高, 且 MDA 的生成量与其浓度呈正相关; 当血卟啉甲醚浓度为 50.000 $\mu\text{g/mL}$, 光照处理 48 h 时, 细胞内 MDA 生成量达到 $173.08 \pm 3.51 \text{ nmol/L}$ 。5,5'-二硫代双-(2-硝基)苯甲酸(DTNB)法对处理后细胞内 GSH 水平测定结果表明, 光活化后的血卟啉甲醚处理 SL 细胞能导致细胞内还原型 GSH 相对含量随血卟啉甲醚浓度升高而显著降低; 当血卟啉甲醚浓度为 50.000 $\mu\text{g/mL}$, 处理 48 h 时, 光照处理组细胞内 GSH 相对含量较之同浓度黑暗处理下降了 39.59%。扫描电镜观察显示, 6.250 $\mu\text{g/mL}$ 的 HMME 处理细胞并光照后, 细胞膜表面出现了明显的孔洞, 有的细胞出现了花样皱褶和内陷。这些结果表明在血卟啉甲醚的试验剂量下, SL 细胞受到了氧化损伤。

关键词: 血卟啉甲醚; 斜纹夜蛾 SL 细胞; 氧化损伤; 丙二醛; 还原型谷胱甘肽; 细胞超微结构

中图分类号: Q965 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2007)08-0782-06

Oxidative damage to *Spodoptera litura* SL cells by hematoporphyrin monomethyl ether

WANG Yu-Jian, XU Han-Hong*, LIAO Shao-Yu, ZHANG Qian-Feng (Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The oxidative damage to *Spodoptera litura* (SL) cells by hematoporphyrin monomethyl ether (HMME), the second generation photosensitizer for PDT, was investigated. IC_{50} value, the output of MDA and the content of GSH, and the alteration of cell organelles were assayed or observed to explore the feasibility of applying HMME and its derivatives to control agricultural pest insects. IC_{50} values obtained with MTT at 24 h and 48 h post HMME treatment with irradiation were 8.35 $\mu\text{g/mL}$ and 7.66 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The results obtained with TBA method showed that photoactivated HMME could induce MDA increasing in dose dependent manner. When the treatment concentration of HMME was 50.000 $\mu\text{g/mL}$, the output of MDA at 48 h post treatment was $173.08 \pm 3.51 \text{ nmol/L}$. The GSH level, however, exhibited a contrary tendency. When the treatment concentration of HMME was 50.000 $\mu\text{g/mL}$, the GSH content decreased by 39.59% compared with the same concentration treatment without irradiation. The SEM photographs showed that distinct pores in SL cells treated with 6.250 $\mu\text{g/mL}$ HMME and irradiation, and sunken and plicate membrane appeared in the treated SL cells. All the evidence indicated that HMME had induced oxidative damage to SL cells.

Key words: Hematoporphyrin monomethyl ether (HMME); *Spodoptera litura* SL cell; oxidative damage; malondialdehyde; glutathione; cell ultrastructure

现有的传统农用型光敏剂(如 $\alpha\text{-T}$)由于需要在 紫外光下激发, 应用受到极大的限制。血卟啉甲醚

基金项目: 广东省自然科学基金重点项目(36837); 广东省财政科技支出项目(2003C20520)

作者简介: 王玉健, 女, 1979 年生, 湖北丹江口人, 博士, 研究方向为光活化农药, E-mail: wyj_success@sohu.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: hhxu@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2006-11-06; 接受日期 Accepted: 2007-07-06

(hematoporphyrin monomethyl ether, HMME) 是叶绿素类前体衍生物, 化学名为 3(8)-(1-甲氧基乙基)-8(3)-(1-羟乙基) 次卟啉 IV (郑红等, 2002), 是由我国独立创新研制的新型光敏剂, 其结构明确, 杀伤效应较强, 是国内唯一用于临床的第 2 代光敏剂(陈杰波等, 2005)。血卟啉甲醚在可见光照射下即可被激发, 形成激发态, 造成质膜光敏化反应。同时由于其激发光源为可见光, 避免使用紫外光源, 且来源于植物, 对植物本身无药害, 对高等动物安全, 因此对于农业害虫防治具有重要的研究价值。

激发态的血卟啉甲醚使三线态氧³O₂ 被激发形成单线态氧¹O₂, 单线态氧¹O₂ 能与机体内的生物大分子如蛋白质、脂质和核酸 DNA 等进行反应, 引起氧化损伤, 从而破坏生物细胞结构, 干扰正常代谢。丙二醛(malondialdehyde, MDA) 是脂质过氧化的终产物之一(庞战军等, 2000), 其生成量反映了细胞脂质过氧化的程度。细胞内的还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH) 是低分子巯基化合物, 具有抗氧化、中和氧自由基的作用, 能明显的抑制过氧化损伤(陈劲涛等, 2006)。同时它还是细胞解毒酶系谷胱甘肽过氧化物酶(GPx) 和谷胱甘肽还原酶(GR) 的底物(Rizzardini *et al.*, 2003)。在细胞许多生化过程中, 它以 GSH、氧化型 GSH (oxidized glutathione, GSSG) 以及混合二硫化物如 GSS-蛋白质等形式发挥作用, 特别对维持细胞和细胞器膜结构的完整性具有重要作用(王捍东等, 2000)。胞内 GSH 的水平反映了细胞消耗和合成 GSH 的平衡能力(Zegura *et al.*, 2006), 也是细胞抗氧化损伤能力的直接反映。

作者以斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* SL 细胞为供试细胞, 研究了血卟啉甲醚对 SL 细胞的 IC₅₀, 处理后细胞内 MDA 生成量、GSH 水平, 并使用扫描电子显微镜观察血卟啉甲醚对细胞器超微结构的影响, 以探索此类光敏素的氧化损伤能力及其在农业害虫防治上的应用潜力。

1 材料与方法

1.1 供试细胞的培养

斜纹夜蛾 SL 细胞购自华中师范大学, 以含 9% 新生小牛血清(杭州四季青)的 Grace 昆虫细胞培养基(Gibco, 美国), 于 5% CO₂、27℃ 孵育箱中常规培养。

1.2 主要仪器与试剂的配制

酶标仪和 7230G 型可见分光光度计分别为 Bio-

Rad 公司和上海长方光学仪器有限公司生产。环境扫描电镜为 FEI-XL30 型(Philips, 荷兰)。DTNB 购自 Sigma-Aldrich 公司。血卟啉甲醚(上海红绿天然保健品研究有限公司提供)以含 2.5% 生理盐水的昆虫细胞培养基配制成梯度溶液。5 mg/mL MTT 溶液的配制 称取 50.0 mg MTT, 加 10 mL 无血清培养基, 待完全溶解后过滤, 置 4℃ 冰箱中待用。溶剂 A 的配制 称取 3 g SDS 溶于 100 mL 异丙醇中, 用 1 mol/L HCl 调 pH 值至 4.5, 置 4℃ 冰箱中待用。所用试剂均为分析纯产品。

1.3 斜纹夜蛾 SL 细胞的处理

取对数生长期细胞接种于培养板内。实验分 2 组:(1) 黑暗对照组, 血卟啉甲醚终浓度为 0 μg/mL、3.125 μg/mL、6.250 μg/mL、12.500 μg/mL、25.000 μg/mL 和 50.000 μg/mL;(2) 光照处理组, 药剂终浓度同黑暗对照组, 加药后在光谱峰值 500 nm、光强为 1 500 μW/cm² 的光源下照射 4 min。以上各组处理完后在 CO₂ 孵育箱中继续培养 24 h 和 48 h。

1.4 血卟啉甲醚对斜纹夜蛾 SL 细胞增殖的影响

MTT 即 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(四甲基偶氮唑蓝), 为一种黄色可溶性物质。活细胞内线粒体脱氢酶能将其还原为蓝紫色的甲臞颗粒, 甲臞的量与活细胞数量成正比, 通过比色法可测定药物对细胞的增殖影响(Hamid *et al.*, 2004)。本实验以 MTT 法测定细胞活力(Mosmann, 1983; Stipanovic *et al.*, 1989; 周青春等, 1997)。各组细胞经药剂处理后, 每孔加入 10 μL 5 mg/mL 的 MTT, 继续培养 4 h。培养结束后每孔加入 100 μL 溶剂 A, 酶标仪上测定 OD₅₇₅ 值。

$$\text{细胞增殖抑制率} = \left(1 - \frac{\text{调零后受试组 OD}_{575}}{\text{调零后对照组 OD}_{575}} \right) \times 100\%$$

1.5 血卟啉甲醚处理后细胞内丙二醛(MDA)生成量测定

参照张卓然(2004), 以 TBA 法测定。以 0.125 mol/L 盐酸配制 16.8% TCA 溶液, 将 41.6 mg 硫代巴比妥酸(TBA)溶于 10 mL TCA-HCl 溶液, 配制 TBA-TCA-HCl 溶液。药剂处理结束后, 将细胞吹下来, 连同培养液一起经超声使细胞破碎, 混匀后取 0.3 mL, 加入 2 mL TBA-TCA-HCl 溶液, 80℃ 水浴 15 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液在 535 nm 处比色。根据 MDA 的摩尔吸收系数 $\epsilon = 1.56 \times 10^5$ mol/L(王辉等, 2005), 计算 MDA 生成量。

1.6 血卟啉甲醚处理后细胞内 GSH 相对含量的测定

参照张卓然(2004), 以 DTNB 法测定细胞内

GSH 的相对含量。96 孔培养板培养的细胞经药剂处理后,倾去培养液,加入 0.1 mol/L PBS(pH 8.0)洗涤各孔,倒掉 PBS,加入 6.5% TCA 0.05 mL,4℃放置 30 min,再加入 0.25 mL 的 DTNB 溶液,10 min 后在 420 nm 处比色。根据以下公式,计算细胞内 GSH 的相对含量。

细胞 GSH 相对含量(%) = $\frac{\text{受试物组吸光度值}}{\text{对照组吸光度值}} \times 100\%$

1.7 扫描电镜观察光活化后的血淋甲醚对 SL 细胞的氧化损伤

将药剂处理后的细胞 1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,4% 戊二醛固定 4 h(4℃),0.1 mol/L PBS 漂洗 3 次,1% 钨酸固定 1 h,PBS 漂洗,按常规方法乙醇梯度脱水,置换,临界点干燥,喷金,在环境扫描电镜下观察。

1.8 数据统计分析

实验数据通过 DPS2000 分析整理,应用邓肯氏新复极差多重比较法(Duncan's multiple range test,DMRT)进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 血淋甲醚对斜纹夜蛾 SL 细胞 24 h、48 h 的增殖抑制活性

血淋甲醚对斜纹夜蛾 SL 细胞的 IC₅₀见表 1。由表 1 可见,光活化后的血淋甲醚处理斜纹夜蛾 SL 细胞 24 h 和 48 h 后的 IC₅₀值分别为 8.35 μg/mL 和 7.66 μg/mL,而黑暗处理后的 IC₅₀值分别为 109.65 μg/mL 和 36.10 μg/mL,表明光活化后的血淋甲醚对斜纹夜蛾 SL 细胞的增殖抑制活性明显提高,因此血淋甲醚有可能作为一种候选的农用光敏素。

表 1 血淋甲醚对斜纹夜蛾 SL 细胞的 IC₅₀

Table 1 The IC ₅₀ value of hematoporphyrin monomethyl ether (HMME) against <i>Spodoptera litura</i> (SL) cells				
处理时间(h) Treatment time	处理方式 Treatment method	毒力回归方程 Toxicity regression equation	IC ₅₀ (μg/mL)	相关系数 Correlation coefficient
24	黑暗 In dark	$y = 3.0655 + 0.9483x$	109.65	0.9772
24	光照 Irradiated	$y = 3.1991 + 1.9534x$	8.35	0.9854
48	黑暗 In dark	$y = 3.0439 + 1.2559x$	36.10	0.9792
48	光照 Irradiated	$y = 3.3652 + 1.8492x$	7.66	0.9858

2.2 血淋甲醚处理后 SL 细胞内 MDA 的生成量

以 2.5%生理盐水处理为参比,同浓度的黑暗处理为对照,测得血淋甲醚处理后斜纹夜蛾 SL 细胞内 MDA 生成量。由表 2 可见,在光照条件下,血淋甲醚受到光照激发后能导致胞内 MDA 含量明显升

高,MDA 的生成量与其浓度呈正相关,表明 SL 细胞受到的脂质氧化损伤程度与血淋甲醚的浓度有关。不同浓度血淋甲醚处理细胞后,黑暗组与光照组 MDA 生成量在 $P = 0.05$ 水平上具有显著性差异。

表 2 血淋甲醚处理后不同时间斜纹夜蛾 SL 细胞内丙二醛的生成量(n = 6)

Table 2 The malondialdehyde (MDA) output in SL cells at different time post treatment with HMME (n = 6)			
血淋甲醚浓度(μg/mL) HMME concentration	处理方式 Treatment method	MDA 生成量 MDA output (nmol/L) (± SE)	
		24 h	48 h
0 (对照 CK)	光照 Irradiated	11.75 ± 2.39 fgh	68.38 ± 4.83 e
	黑暗 In dark	6.41 ± 3.70 h	44.87 ± 6.72 f
3.125	光照 Irradiated	25.64 ± 7.40 e	65.17 ± 5.23 e
	黑暗 In dark	7.48 ± 4.41 gh	36.32 ± 6.30 g
6.250	光照 Irradiated	37.79 ± 9.37 d	86.54 ± 7.02 d
	黑暗 In dark	16.03 ± 3.21 fg	38.46 ± 5.36 fg
12.500	光照 Irradiated	60.90 ± 6.14 c	101.50 ± 6.62 c
	黑暗 In dark	8.55 ± 6.04 gh	40.60 ± 7.49 fg
25.000	光照 Irradiated	94.02 ± 9.56 b	134.62 ± 5.36 b
	黑暗 In dark	19.23 ± 6.41 ef	43.80 ± 7.76 fg
50.000	光照 Irradiated	125.00 ± 6.14 a	173.08 ± 3.51 a
	黑暗 In dark		

注 Notes :表中数据为平均值 ± SE,同列数据后字母相同者表示差异不显著(P > 0.05, DMRT) 表 3 同。Values in the table are mean ± SE, and those in the same column followed by the same letter were significantly different (P > 0.05) according to DMRT. The same for Table 3.

2.3 血卟啉甲醚处理后斜纹夜蛾 SL 细胞内 GSH 的相对含量

表 3 数据表明,光活化后的血卟啉甲醚处理 SL 细胞能导致细胞内还原型 GSH 相对含量随血卟啉甲醚浓度升高而显著降低。而细胞内还原型 GSH 水平

是细胞抗氧化能力的表征,由此可推知随血卟啉甲醚浓度升高,细胞的抗氧化能力逐渐减弱。药剂浓度相同时光照处理组与黑暗处理组在 $P = 0.05$ 水平上有显著性差异。

表 3 血卟啉甲醚处理后不同时间细胞内 GSH 相对含量 ($n = 8$)
Table 3 The relative content of GSH in SL cells at different time post treatment with HMME ($n = 8$)

血卟啉甲醚浓度 HMME concentration ($\mu\text{g/mL}$)	24 h			48 h		
	GSH 相对含量 (%) Relative content of GSH		GSH 降低率 (%) Rate of GSH decrease	GSH 相对含量 (%) Relative content of GSH		GSH 降低率 (%) Rate of GSH decrease
	黑暗 In dark	光照 Irradiated		黑暗 In dark	光照 Irradiated	
3.125	93.35 $\pm$ 2.42 a	87.42 $\pm$ 2.31 c	5.93	89.03 $\pm$ 2.79 ab	76.38 $\pm$ 2.93 d	12.65
6.250	91.01 $\pm$ 3.26 ab	76.41 $\pm$ 3.43 d	14.60	90.26 $\pm$ 2.66 a	68.97 $\pm$ 1.07 e	21.29
12.500	91.01 $\pm$ 4.74 ab	67.23 $\pm$ 2.27 e	23.78	89.15 $\pm$ 3.79 ab	60.93 $\pm$ 1.69 f	28.22
25.000	89.21 $\pm$ 4.12 bc	59.90 $\pm$ 1.31 f	29.31	87.42 $\pm$ 3.61 bc	52.64 $\pm$ 1.13 g	34.78
50.000	90.83 $\pm$ 4.02 ab	54.00 $\pm$ 2.44 g	36.83	85.57 $\pm$ 1.93 c	45.98 $\pm$ 1.61 h	39.59

2.4 血卟啉甲醚作用后 SL 细胞的形态变化

由图 1(A ~ C)可见,不同处理方式的对照组细胞呈不规则的圆形、椭圆形、纺锤形,大小约在 $7.0 \times 9.9 \sim 13.5 \times 12.8 \mu\text{m}$,表面可见微绒毛(图 1:C)。由图 1(D ~ F)可见,6.250 $\mu\text{g/mL}$ 的血卟啉甲醚处理细

胞并光照后,细胞形态、大小无明显变化,但细胞膜表面出现了明显的孔洞,孔洞直径在 $0.21 \mu\text{m} \sim 0.80 \mu\text{m}$,孔洞位置无规律(图 1:D, E)。有的细胞出现了花样皱褶和内陷(图 1:F)。细胞表面微绒毛消失(图 1:D ~ F)。

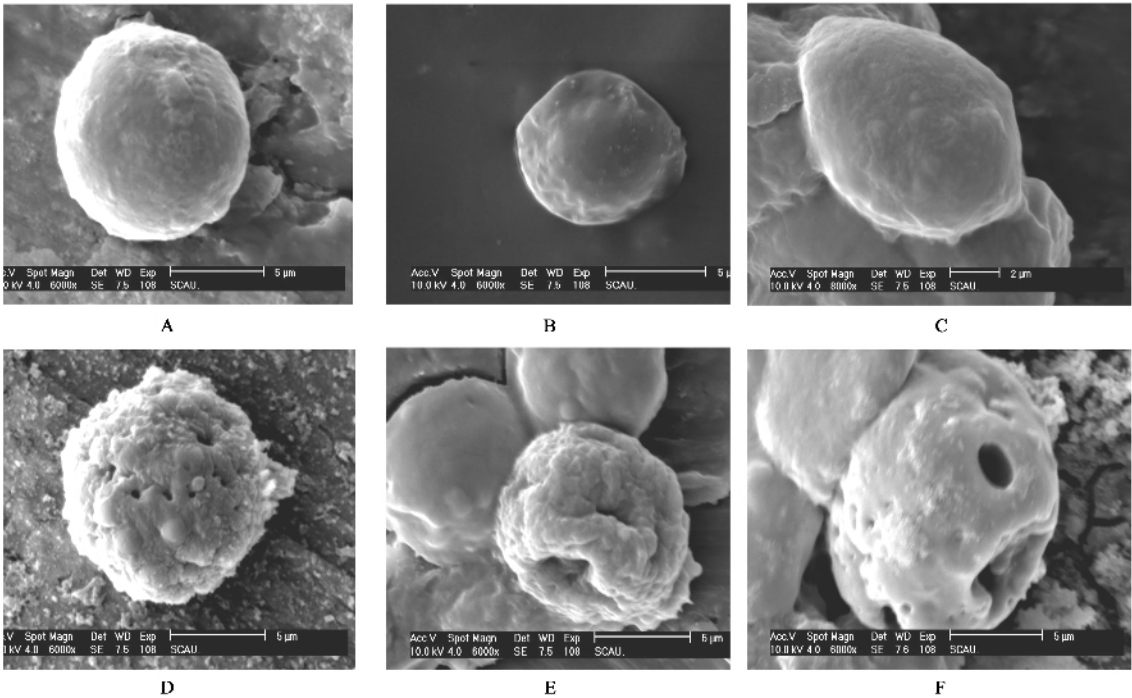


图 1 不同处理斜纹夜蛾 SL 细胞的 SEM 照片

Fig. 1 SEM photographs of *Spodoptera litura* cells with different treatments
A :紫外线照射 3 min 的正常细胞 Normal cell irradiated for 3 min ; B :经 2.5%生理盐水光照处理 3 min 的细胞 SL cell treated with 2.5% physiological saline and irradiated for 3 min ; C :经 6.250 $\mu\text{g/mL}$ hematoporphyrin monomethyl ether (HMME) 黑暗处理的细胞 SL cell treated with 6.250 $\mu\text{g/mL}$ HMME whereas without irradiation ; D :HMME 浓度为 6.250 $\mu\text{g/mL}$ 时的光照处理细胞膜表面出现孔洞 Photograph showed the pores in the membrane of SL cell treated with 6.250 $\mu\text{g/mL}$ HMME and irradiated ; E :HMME 浓度为 6.250 $\mu\text{g/mL}$ 时的光照处理细胞膜内陷并出现大孔洞 Photograph showed the sunken membrane and big pores in SL cell treated with 6.250 $\mu\text{g/mL}$ HMME and irradiated ; F :HMME 浓度为 6.250 $\mu\text{g/mL}$ 时的光照处理细胞膜表面皱褶 Photograph showed the plicate membrane of SL cell treated with 6.250 $\mu\text{g/mL}$ HMME and irradiated.

3 讨论

激发态血卟啉甲醚产生的 ROS 能引发脂质过氧化。生物膜和亚细胞器是脂质过氧化作用损伤的主要部位。脂质过氧化反应能生成自由基、氢过氧化物、羰基化合物等产物。氢过氧化物分解时能产生毒性更大的烷氧自由基 (RO·)、过氧自由基 (ROO·)、羟自由基和一些活泼的醛类。MDA 是脂质过氧化产物初级、次级裂解的终产物之一,胞内 MDA 的含量能反映出细胞受到脂质过氧化损伤的程度。本研究发现光活化后的血卟啉甲醚处理细胞后,细胞内 MDA 含量明显增加,且随药剂浓度升高而升高,表明激发态的血卟啉甲醚损伤 SL 细胞的重要机制之一是细胞内巯基稳态的失衡及质膜的脂质过氧化(王刚石等,1999)。

GSH 是广泛存在于细胞内的小分子三肽化合物,是细胞内最丰富的低分子巯基化合物,能清除自由基、脂质过氧化物(林秀梅等,2004),细胞内 GSH 的水平直接反映了细胞的抗氧化能力。本研究发现,激发态的血卟啉甲醚能导致细胞内 GSH 含量下降,并随着药剂浓度的升高,还原型 GSH 水平呈明显递减趋势,表明光活化后的血卟啉甲醚导致了 SL 细胞抗氧化损伤能力的减弱。

扫描电镜观察发现,6.250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的血卟啉甲醚处理 SL 细胞并光照后,细胞膜表面出现了明显的孔洞或皱褶和内陷,通透性发生改变,造成细胞膜结构和功能的改变,最终导致细胞死亡。

光活化杀虫剂通过光动力过程发挥杀虫作用,血卟啉甲醚由于能通过可见光激活,较之传统的光活化杀虫剂更有优势,应用于农业害虫防治前景广阔。随着对光活化杀虫剂作用机制更深入的研究和阐明,我们能通过优化其杀虫效力以及从组织和细胞水平上控制其在生物体内的分布,将光敏剂定向分布于对生物体功能和代谢起关键作用的部位,如细胞膜、核膜、血脑屏障等,从而更有效、更合理地使用光活化杀虫剂。

参考文献 (References)

Chen JB, Xu XP, Ou MR, Xie J, 2005. Effect of photodynamic therapy using HMME on benign prostatic hyperplasia in rats: a preliminary experimental investigation. *Journal of Fuzhou University (Natural Science)*, 33(4): 545–548. [陈杰波, 许小平, 欧敏锐, 谢俊, 2005. 血卟啉甲醚-光动力学疗法去除大鼠前列腺增生的实验研究. 福州大学学报(自然科学版), 33(4): 545–548]

Chen JT, Feng QM, Tao BH, Yu XM, 2006. Protective effect of reduced glutathione on liver function in severe multiple trauma patients. *Chinese Journal of Critical Care Medicine*, 26(6): 424–426. [陈劲涛, 封后明, 陶宝华, 郁晓明, 2006. 还原型谷胱甘肽对严重多发伤患者肝功能的保护作用. 中国急救医学, 26(6): 424–426]

Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P, 2004. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in Vitro*, 18(5): 703–710.

Lin XM, Xie ZX, Qin Q, 2004. Influence of neferine and erythromycin on cellular GSH concentration in K562/A02 cell line. *Journal of Central South University (Medical Sciences)*, 29(3): 284–286. [林秀梅, 谢兆霞, 秦群, 2004. 甲基莲心碱、红霉素对 K562/A02 细胞内谷胱甘肽含量的影响. 中南大学学报(医学版), 29(3): 284–286]

Mosmann T, 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods*, 65: 55–63.

Pang ZJ, Zhou M, Chen Y, 2000. Medicine Methodology about Free Radical. Beijing: People's Medical Publishing House. 61–62. [庞战军, 周玫, 陈媛, 2000. 自由基医学研究方法. 北京: 人民卫生出版社. 61–62]

Rizzardini M, Lupi M, Bernasconi S, Mangolini A, Cantoni L, 2003. Mitochondrial dysfunction and death in motor neurons exposed to the glutathione-depleting agent ethacrynic acid. *J. Neurol. Sci.*, 207(1–2): 51–58.

Stipanovic RD, Elissalde MH, Altman DW, 1989. Cell culture bioassay to evaluate allelochemical toxicity to *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 83: 737–741.

Wang GS, Sun GH, Chen SS, 1999. Effects of somatostatin on human gastric mucosal cell line GES-1 injured with hydroxyl radicals. *Chinese Journal of Applied Physiology*, 15(2): 180–183. [王刚石, 孙桂华, 陈慎实, 1999. 生长抑素对羟自由基损伤的人胃粘膜上皮细胞系 GES-1 的影响. 中国应用生理学杂志, 15(2): 180–183]

Wang H, Yang L, Yang J, Luo SD, 2005. Effect of isoliensinine on lipid peroxidation in rat liver homogenate. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 25(5): 402–404. [王辉, 杨柳, 杨俊, 罗顺德, 2005. 异莲心碱对大鼠肝匀浆脂质过氧化的影响. 中国医院药学杂志, 25(5): 402–404]

Wang HD, Xing H, Bian JC, Liu XZ, Ren JX, Wang ZY, 2000. Cadmium induced cellular injury in isolated rat primary hepatocytes. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 20(6): 580–583. [王捍东, 邢华, 卞建春, 刘学忠, 任建新, 王宗元, 2000. 镉对原代培养大鼠肝细胞的损伤作用. 中国兽医学报, 20(6): 580–583]

Zegura B, Lah TT, Filipic M, 2006. Alteration of intracellular GSH levels and its role in microcystin-LR-induced DNA damage in human hepatoma HepG2 cells. *Mutat. Res.*, 611(1–2): 25–33.

Zhang ZR, 2004. Cultural Cytology and Technique for Cell Culture. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press. 430–431. [张卓然, 2004. 培养细胞学与细胞培养技术. 上海: 上海科学技术出版社. 430–431]

Zheng H, Yao JZ, Liu JF, 2002. Study on stability of hermimether injection. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 33(1): 32–33. [郑红, 姚建忠, 刘建飞, 2002. 血卟啉甲醚注射液的稳定性研究. 中

国医药工业杂志, 33(1):32-33]

Zhou QC, Yang H, Wang H, Hong HZ, 1997. Studies on new bioassays for pesticide: II. The establishment and further development of cytobioassay for insecticide. *Journal of Huazhong Normal University (Nat. Sci. Ed.)*, 31(4):456-459. [周青春, 杨红, 汪虹, 洪

华珠, 1997. 农药生物测定新方法的研究: II. 杀虫剂细胞生测体系的建立及改进. 华中师范大学学报(自然科学版), 31(4): 456-459]

(责任编辑: 黄玲巧)